5 例前列腺癌 T 细胞受体β链 CDR3 的多样性分析

潘卫兵[1]，曾启昂[2]，朱鹏[2]，王凯[2]，刘松[3]

[1]（1.深圳市坪山区人民医院泌尿外科，2. 深圳市坪山区人民医院中心实验室，3.深圳市人民医院临床医学研究中心 广东 深圳 518118）

摘要：T 淋巴细胞受体（TCRs）在抗原识别免疫应答中作用重要，其多样性与宿主免疫反应及肿瘤预后判断密切相关。目的：采用高通量测序技术研究前列腺癌组织和癌旁组织中 T 细胞受体（TCR）克隆多样性及其克隆序列。方法：收集 5 例 PC 患者的癌组织和癌旁组织，提取 DNA 后经多重 PCR 技术对 TCR β链 CDR3 区进行扩增。用 Illumina MiSeq 进行测序，经过数据处理和比对分析，比较前列腺癌组织 TCR CDR3 组库的组成特征。结果：前列腺癌组织具有更高程度的克隆百分比和较高的高度扩增克隆比 HEC（HEC：频率>样本总读数的 0.5%的 TCR 克隆），并获得了 24 对在癌组织样本中差异表达的 V-J 基因组合、16 对在癌旁组织样本中差异表达的 V-J 基因组合。结论：前列腺癌组织与癌旁组织均存在差异性的 V-J 基因组合以及高克隆表达的 HEC，其中癌组织样品具有更高的 HEC。本研究对 PC 发生发展的免疫学研究提供了新的数据，对 PC 免疫监视、T 细胞受体变异标志等研究提供了参考，对以后继续研究打下了基础。

关键词：前列腺癌；Tcell 受体；免疫组库；高通量测序

Diversity analysis of 5 CDR3s of T cell receptor β chain in prostate cancer

Abstract: T lymphocyte receptors (TCRs) play an important role in antigen recognition immune response, and their diversity is closely related to host immune response and tumor prognosis. OBJECTIVE: To investigate the clonal diversity and cloning sequence of T cell receptor (TCR) in prostate cancer tissues and paracancerous tissues by high-throughput sequencing. METHODS: The cancer tissues and paracancerous tissues of 5 patients with PC were collected. After DNA extraction, the CDR3 region of TCR β chain was amplified by multiplex PCR. Sequencing was

---

[1] 基金项目：1.深圳市坪山新区医疗卫生发展孵化资助资金项目（编号：201608）；2.深圳市科技创新委员会知识创新计划基础研究（编号：JCYJ20140416095712714）

*第一作者：曾启昂，男，1992，深圳市坪山区人民医院中心实验室，本科学历，助理研究员，研究方向：基因与遗传学；通讯地址：深圳市坪山区人民医院；邮编：518118；电话：13129477835；电子邮件：504784599@qq.com

*通讯作者：潘卫兵，男，深圳市坪山区人民医院，本科学历，主任医师，长期从事泌尿外科临床与教学工作，研究方向：基因与遗传。通许地址：深圳市坪山区人民医院；邮编：518118；电子邮件：1329700025 @qq.com

performed with Illumina MiSeq, and the composition characteristics of the TCR CDR3 library of prostate cancer tissues were compared by data processing and comparison analysis. RESULTS: Prostate cancer tissues had a higher degree of cloning and higher high-amplification clones than HECs (HEC: frequency > 0.5% TCR clones of total sample reads) and obtained 24 pairs of differential expression in cancer tissue samples The VJ gene combination, 16 pairs of VJ gene combinations differentially expressed in paracancerous tissue samples. Conclusion: There are different V-J gene combinations and high cloned HEC in prostate cancer tissues and adjacent tissues, and cancer tissue samples have higher HEC. This study provides new data for immunological research on the development of PC, and provides reference for research on PC immune surveillance and T cell receptor mutation markers, laying a foundation for further research.

Keywords: prostate cancer; Tcell receptor; immune pool; high-throughput sequencing

前列腺癌（PC）是男性泌尿系统中常见的恶性肿瘤疾病之一，近年来随着人口老年化，在我国的发病率及死亡率逐年上升，具有明显的种族及地域性差异，且大多数患者在确诊时已经属于晚期。PC 在欧美国家甚至跃居癌症死亡率第 2 位，据统计 2016 年美国新发及死亡的前列腺癌患者人数分别为 180890 和 26120[1-2]。目前临床上治疗手段主要有手术、放疗和雄激素剥夺疗法，也出现了以 sipuleucel-T、GVAX、prostvac 等为疫苗的治疗方法，同时以免疫抑制剂进行抗肿瘤治疗研究已出现 [3]，免疫治疗作为 PC 的治疗热点，可刺激机体产生针对肿瘤抗原特异性的抗肿瘤免疫反应。由于前列腺癌发生和发展机制极为复杂，在临床上对于治疗策略的选择仍比较棘手，因此，急需对 PC 潜在的机制进行研究，分析其中的免疫微环境情况，并结合相关免疫疗法进行治疗。

T 细胞主要功能是介导细胞免疫，在免疫微环境中起着关键作用，T 细胞抗原受体（Tcell receptor，TCR）是 T 细胞表面结合抗原的分子结构，由两条链组成，α链和β链，少数 TCR 由γ和δ肽链组成[4]。每一条链包含了可变区（V 区）、恒定区（C 区）、胞质区和跨膜区，其中α链和β链的高变 V 区含有三个部分：CDR1、CDR2、CDR3，CDR3 变异最大且组成了最具多样性的 CDR3 受体。已有研究证实，这种多样性的结构是由胚系 V、J、D、C 基因片段的随机重排和体细胞高突变而形成，其多变的特征为抗原的选择提供了一个多样化的细胞受体库[5-6]。

高通量测序又称第二代测序（next generation sequencing，NGS），能够同时对上百万个 DNA 分子进行平行测序，使得对一个物种的基因组和转录组进行大规模的分析成为可能，为复杂基因组的分子结构研究提供了一个便利工具，具有高通量、高精度、高敏感度等优点[7]。随着该技术的发展，可以一次测出大量 CDR3 序列并对 TCR CDR3 受体库进行相关研究，为免疫系统机制的探索提供了一种有效的方法。在本研究中，NGS 用于检测前

列腺癌组织与癌旁组织成对连续样品之间的 CDR3 多样性，通过设计各 V 区家族和 J 区家族引物扩增出 TCR 的所有 CDR3 区，采用高通量测序，分析癌组织和癌旁组织之间的不同 TCR 序列组成，为揭示癌组织与癌旁组织的免疫特性和提高对免疫微环境特征的了解，并为寻找获得有效的靶向治疗策略奠定基础。

1. 方法与材料

1.1 一般资料

病例取自深圳市人民医院的 5 例 PC 患者，收集患者的癌组织和癌旁组织。患者皆经过确诊的 PC 病理诊断，无转移，平均年龄 65.80±9.80 岁（范围，56-76 岁）。患者均签署知情同意书，有完整的临床资料和其他各种相关资料。

1.2 样本组织 DNA 提取及 PCR 建库

用 Qiagen DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取，使用 Qubit fluorome-ter 测定 DNA 浓度。取 500ng 基因组 DNA 作为反应起始量，同时作为模板。加入特异设计的 V 区基因和 J 区基因引物，形成分别对应 V 区基因、J 区基因的引物簇，用 QIAGEN multiplex PCR Kit 进行多重 PCR，以扩增重排的 TCR-β CDR3 区域。接着电泳检测 100-190bp 的多重 PCR 产物，用 QIAquick Gel Extration 进行回收。向产物加入 End Repair Mix，在 20℃进行末端修复反应，并用 QIAquick PCR Purification Kit 进行纯化去除引物序列。经过末端修复后的 DNA 片段 3′ 端连上“A”碱基，再用 Adapter oligo mix 和 DNA ligase 配制接头连接反应体系进行接头连接。通过 PCR 反应富集经过接头修饰的 DNA 片段，对产物进行琼脂糖凝胶电泳，最后用 QIAquick Gel Extraction kit 进行胶纯化回收，得到目的片段，完成文库的构建。

1.3 文库检测与测序

用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测文库的插入片段范围，检测合格的片段加入 NaOH 溶液使之变性成为单链，稀释后加入到 Flow Cell 中。与 Flow cell 接头杂交后的片段进行桥式 PCR 扩增，此过程在 cBot 平台上结合 Truseq PE Cluster kit v3-cBot-Hs 试剂进行，最后在 Illumina MiSeq 平台上完成自动化测序。

1.4 数据分析

数据下机后，对原始数据进行过滤和拼接等预处理，得到合并序列，用 milaboratory 开发的 miTCR 软件进行比对，自动校正序列错误。比对完成后，自动统计 CDR3 克隆的表达及插入缺失情况。根据比对分析得到的结果，从 V-J 组合表达情况等水平进行样品多样性差异分析和克隆表达差异分析。

2. 结果

本研究招募了 5 名 PC 患者，并从每位患者获取癌组织和癌旁组织病理切片用于 DNA 提取，利用高通量测序方法研究两种样本中的 TCR 序列图谱。将原始数据过滤后，总共得到的癌组织和癌旁组织样本中映射免疫序列读数的数量分别为 626974 和 372420。获得的癌症样本的克隆类较多。

2.1 高度扩增的克隆（hyper express clone-type）分析

每个克隆的表达水平以该 Clone 在测试样本中出现的次数/该样本的总优质序列数计算，并且每个克隆的扩增程度基于每个独特 CDR3 序列的频率，其中频率>样本总读数的 0.5%的 TCR 克隆定义为高度扩增克隆比 HEC。我们将克隆扩增程度按 HEC 阈值分为≤0.001%,0.001-0.01%,0.01-0.1%,0.1-1%,≥1%五个等级。结果显示，在癌症样本中有 26 个 HEC，HEC 的比率为 0.35；在癌旁组织样本中，仅有 8 个克隆被定义为 HEC，HEC 比率为 0.23，可以看出 PC 患者癌组织中高度扩增性克隆数明显多于癌旁对照组（表 1）。大多数的 TCR 克隆以低频率存在，高度扩增性克隆（HEC）所占的比例很小，进一步计算具有不同克隆表达程度的克隆百分比，在癌组织样本中，表达程度为 0.01-0.1%的克隆占 23.85%，而表达程度 0.1-1%的克隆占 70.11%；在癌旁组织样本中，表达程度为 0.01-0.1%的克隆占存在的 T 细胞序列的 38.94%，表达度为 0.1-1%的克隆占 35.36%（图 1）。总而言之，相对于癌旁组织样本，癌症样本具有更高的 HEC 比率和更高程度的克隆百分比。

表 1　癌症和癌旁组织中的 HEC

Table 1　HEC in cancer and adjacent tissues

类型	癌症组织	癌旁组织
HEC 数量	26	8
HEC 比率	0.35	0.23

HEC：高度扩增克隆比

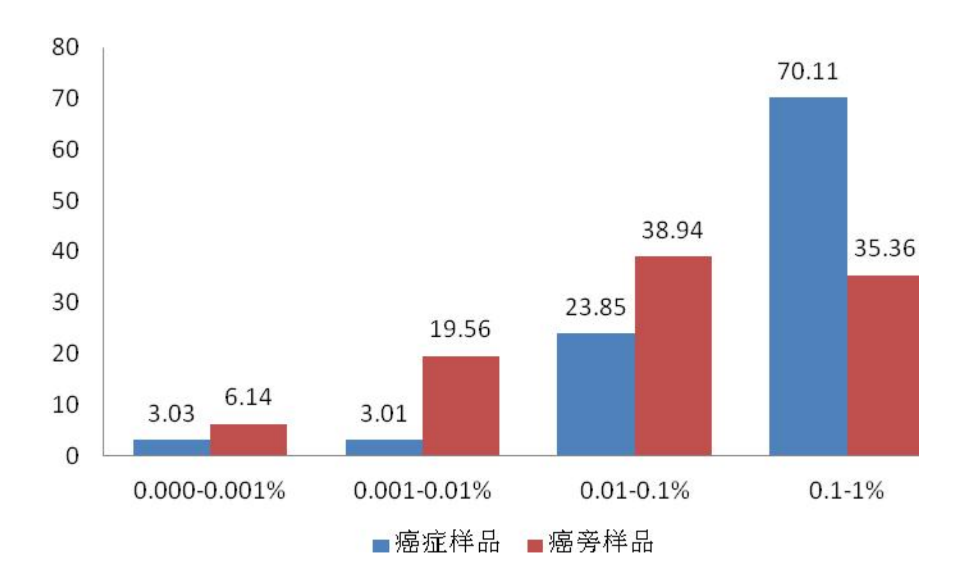


图 1　癌组织与癌旁组织 CDR3 碱基序列在各个克隆频率分布段的克隆分布情况

Fig.1 Clonal distribution of CDR3 base sequences in cancer tissues and adjacent tissues at each cloning frequency distribution

The X axis represents the four clone frequency distribution segments, and the Y axis is the percentage of the corresponding frequency distribution segment

2.2 T 细胞β链可变区基因（TRBV）和交联区基因（TRBJ）序列谱的比较

为了确定 T 细胞 β 链可变区基因（TCR beta chain variable gene, TRBV）和交联区基因（TCR beta chain junction gene, TRBJ）序列谱中是否存在任何疾病特异性差异，我们比较了癌症组和癌旁组中各 TRBV 和 TRBJ 亚类的表达水平，总共包括了 58 个 TRBV 片段和 14 个 TRBJ 片段。结果显示，除了 TRBV2、TRBV15 和 TRBV7-8，癌症组中有 55 个 TRBV 亚型的表达水平明显异于癌旁样本组（图 2），14 个 TRBJ 亚型的表达水平在两组样本中都表现出极大的变化（图 3）。至于 TRBJ 基因的使用比例，在癌症样本中为 0.13%至 29.65%，而在癌旁样本中该数据为 0.27%至 23.95%。因此，癌症组和癌旁组样本中的 V、J 基因亚型都出现了绝大多数的差异性表达，以上这些数据可以说明癌症组和癌旁组样本中特定的 V、J 基因可能存在克隆扩增。

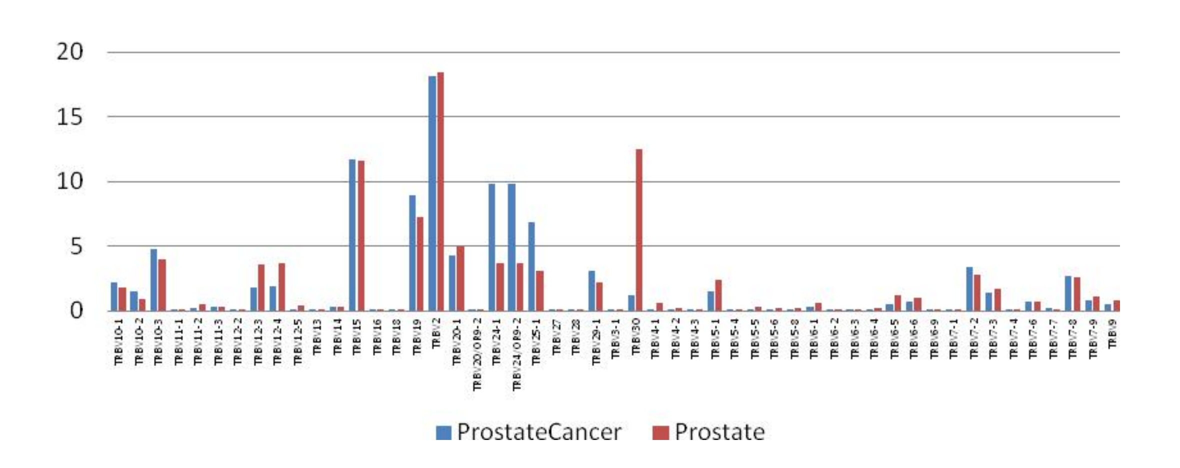


图 2　癌症与癌旁组织的 V 基因比对情况

Fig.2 Comparison of V gene between cancer and adjacent tissues

The X axis represents the V gene subtype, and the Y axis represents the percentage of the corresponding V subtype in the sample

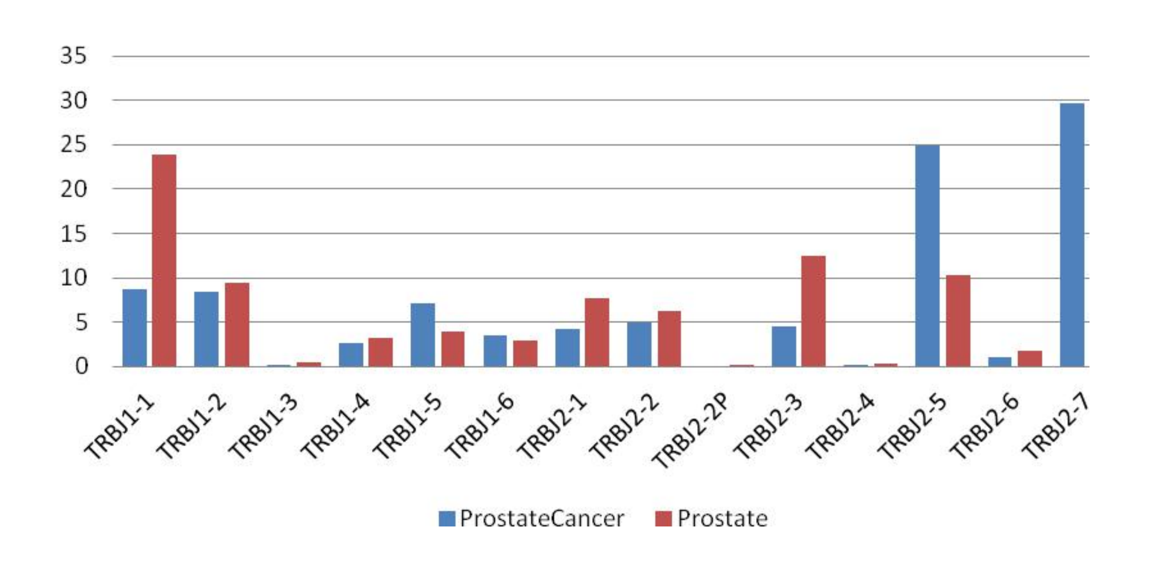


图 3　癌组织与癌旁组织的 J 基因比对情况

Fig.3 Comparison of J gene between cancerous tissue and adjacent cancer tissue

The X axis represents the J gene subtype, and the Y axis represents the percentage of the corresponding J subtype in the sample

2.3 TRBV 和 TRBJ 基因配对差异分析

通过分析 TRBV 和 TRBJ 基因亚家族的表达水平，我们发现了前列腺癌相关的 V、J 基因，随后，通过获得每个样品的 V-J 组合频率并分析该组合的使用频率差异，我们发现了更加有价值的信息。这里统计的是高表达的配对组合（表达程度〉1%），结果显示，在癌症组和癌旁组中出现有重叠的配对组合，也有表现出显著差异的配对。其中有 24 对组合在

癌症组各样本中出现显著差异表达（表 2），有 16 对组合在各癌旁组织样本中出现差异表达（表 3）。例如 TRBV24-1-TRBJ2-7 配对在癌症样本中最高表达（12.39%），在癌旁样本中低表达（<1%）；TRBV30-TRBJ1-1 在癌旁样本中高表达（10.07%），在癌症样本中低表达（<1%）。这些数据表明了特定的 V-J 基因配对对前列腺癌组织具有特异性。

表 2　VJ 基因配对在癌症样本中的应用

Table 2 Application of VJ gene pairing in cancer samples

VJ Gene	Degree of expression（%）
TRBV24-1：TRBJ2-7	12.39
TRBV15：TRBJ2-5	5.49
TRBV24-1：TRBJ2-5	4.65
TRBV2：TRBJ2-5	3.78
TRBV2：TRBJ2-7	3.45
TRBV2：TRBJ1-5	3.34
TRBV2：TRBJ1-1	2.85
TRBV19：TRBJ2-5	1.92
TRBV25-1：TRBJ2-5	1.67
TRBV19：TRBJ1-2	1.61
TRBV25-1：TRBJ2-7	1.54
TRBV25-1：TRBJ2-3	1.52
TRBV10-1：TRBJ2-5	1.41
TRBV15：TRBJ2-7	1.40
TRBV10-3：TRBJ2-7	1.40
TRBV15：TRBJ1-6	1.38
TRBV7-2：TRBJ2-7	1.38
TRBV2：TRBJ2-2	1.32
TRBV12-3：TRBJ2-7	1.29
TRBV7-8：TRBJ2-7	1.18
TRBV10-3：TRBJ25	1.16
TRBV19：TRBJ2-7	1.15
TRBV19：TRBJ1-1	1.07
TRBV20-1：TRBJ1-2	1.02

表 3　VJ 基因配对在癌旁样本中的应用

Table 3　Application of VJ gene pairing in paracancerous samples

VJ Gene	Degree of expression（%）
TRBV30：TRBJ1-1	10.07
TRBV15：TRBJ2-3	7.15
TRBV2：TRBJ2-7	5.21
TRBV2：TRBJ1-1	3.93
TRBV24-1：TRBJ1-1	3.57
TRBV2：TRBJ2-5	2.07
TRBV19：TRBJ1-2	1.80
TRBV2：TRBJ1-2	1.78
TRBV20-1：TRBJ2-7	1.25
TRBV2：TRBJ2-3	1.21
TRBV2：TRBJ2-2	1.21
TRBV12-3：TRBJ2-7	1.20
TRBV12-3：TRBJ1-2	1.18
TRBV29-1：TRBJ1-4	1.16
TRBV15：TRBJ2-5	1.03
TRBV2：TRBJ2-1	1.00

3.　讨论

前列腺癌发病率逐年提高，早期的 PC 预后较好，但是当发展到转移性去势抵抗性前列腺癌阶段，就很难治疗。原发性肿瘤的免疫微环境与疾病发生存在着关联，而免疫治疗作为前列腺癌治疗的热点，可通过激活宿主免疫细胞特异性攻击前列腺癌细胞产生肿瘤特异性免疫，这是一种新兴的方法，为前列腺癌的治疗提供了新的方向[8-9]。肿瘤组织浸润着大量 T 淋巴细胞，T 细胞受体以其 V 区 CDR3 结构与 MHC 结合，每个 T 细胞只表达一种 TCR CDR3，因此形成了 T 细胞群的多样性[10]。本研究中，我们使用新技术 NGS 来研究 PC 和前列腺癌旁组织样品中的建立在 CDR3 多样性基础上的 TCR 谱系，结果分别在 PC 和前列腺癌旁组织样本中获得了在数据库成功比对并识别为免疫序列的读数 626974 和 372420，提供了大量 PC 中 TCR 谱系的信息，为进一步的研究奠定了基础。

我们发现大多数的 TCR 克隆以低频率存在，在癌症和癌旁样本中以高频率出现的序列较少，表明了这些低频率的克隆没有进行克隆性扩增。当我们将频率〉样本总读数的 0.5%的 TCR 克隆定义为 HEC，结果显示每个个体的 TCR CDR3 图谱中还是存在一些高度扩增性克隆。与前列腺癌旁组织样本相比，PC 样本中的 TCR 谱具有更多的 HEC，更高的 HEC 比率。其中 PC 样本存在 26 个 HEC，HEC 的比率为 0.35，而癌旁组织样本中仅有 8 个克隆被定义为 HEC，HEC 比率为 0.23，表明癌症患者组织中高度扩增性克隆数明显多于癌旁样本组，癌症组织具有更偏斜的克隆型组成。然而，本研究并没有发现癌症组不同个体间存

在相同的高克隆 HEC，这有可能是由于个体免疫系统存在复杂性和个体的差异性，不同组织样本间存在同样的异质性。许多先前的研究大多是探讨 PC 患者的前列腺切除术或检查组织中的促肿瘤活性等[11-12]，因此发现不同 PC 个体中的共同 HEC 也许对 PC 组织特殊标志物的发现有研究价值。对 PC 组织中不同个体是否存在相同的 HEC 需要进一步的研究。

在个体发育过程中，TCR β链的 V、D、J 基于片段发生重排，形成具有高度多样性的可变区 CDR3，CDR3 决定了一个独特的 TCR 克隆型。机体在疾病状态下 TCR 基因会发生针对性的重排，因为体内存在某些特定的抗原，这种重排会使机体选择性地表达了某些家族的 T 细胞，然后出现 TCR 特异性的 T 细胞克隆性增殖现象[13-14]。本研究中我们挖掘出了与 PC 疾病相关的 V、J 基因，也发现 V－J 基因组合（配对）的差异表达更加有研究价值，其中有 24 对组合在癌症组各样本中出现显著差异表达，有 16 对组合在癌旁组织各样本中出现差异表达，这些数据表明了特定的 V-J 基因配对对前列腺癌组织具有特异性。

本研究选择病例较少，另外，缺少对组间共有高度克隆 HEC、CDR3 的氨基酸差异等进行深入的分析，也没有及时收集相同患者的外周血作为一实验组。但是，我们从免疫微环境角度、序列的水平并用高通量测序探索了整个 TCR 谱系，这对 PC 疾病的致病机理、进一步研究肿瘤微环境特性、肿瘤特异性抗原的鉴定以及对疾病诊断治疗提供了新的数据和新的分析思路，对以后继续研究打下了基础。

参考文献

[1] Wei W,Juan J,Lei L,et al.The role of exosomes in the development and metastasis of prostate cancer.Chinese Journal of Modern Medicine,2018,28(06):38-44.

[2] Shen L,Xiaohou W,et al.New progress in the diagnosis of prostate cancer.Chongqing Medical,2017,46(15):2150-2152.

[3] Zhonglin C,Qiangzhao L,Zhaoyang W,et al.Progress in clinical application of high intensity focused ultrasound in the treatment of prostate cancer.Modern oncology medicine,2017,25(12):2011-2014.

[4] Ying Z,Shunkai D,Liewen L,et al.Difference analysis of CDR3 between tumor tissue and peripheral blood T cell receptor in patients with gastric cancer.Translational Medicine E-Magazine,2018,5(04):21-25.

[5] Ming J,Zewei Z,Hao Z,et al.Relationship between T cell receptor polymorphism and disease.Modern immunology,2013,33(03):247-251.

[6] Liu S, Pan W, Cheng Z, et al. Characterization of the T-cell receptor repertoire by deep T cell receptor sequencing in tissues from patients with prostate cancer.Oncology Letters, 2018, 15(2):1744-1752.

[7] DEWEY F E, GROVE M E, PAN C, et al. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing .JAMA, 2014, 311 (10) :10351045.

[8] Yan L,Huixin G,Wenling W,et al.Progress in immunotherapy of prostate cancer.Medical review,2016,22(12):2334-2338.

[9] GENITSEN WR, SHARMA P.Current and emerging treatment options for castration-resistant prostate cancer:a focus on immunotherapy .J Clin Immunol, 2012, 32 (1) :25-35.DOI:10.1007/s10875-011-9595-6.

[10] Xiaosong Z.T cell receptor and tumor immunotherapy.Foreign Medicine (Immunology Volume),1996(04):200-203.

[11] Strasner A and Karin M. Immune infiltration and prostate cancer.Front Oncol 5: 128, 2015.

[12] Derhovanessian E, Adams V, Hähnel K, Groeger A, Pandha H, Ward S and Pawelec G.Pretreatment frequency of circulating IL- 17+CD4+ T- cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole- cell vaccination in prostate cancer patients.Int J Cancer 125: 1372- 1379, 2009.

[13] Tian Z,Suhong S.High-throughput sequencing technology for detection of T & B cell CDR3 receptor library in clinical application.Chinese Journal of Clinicians, 2014, 8(9).

[14] Peng W,Xiaoyang H,Xiaomei W,et al.Overview of high-throughput sequencing analysis of T cell CDR3 receptor library.Chinese Journal of Immunology, 2011, 27(10):512-516.